

*На правах рукописи*



ГАБИТОВА ЛИНАРА РУСТАМОВНА

**РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРИНА В  
ПОДАВЛЕНИИ РАЗВИТИЯ KRAS-ОПОСРЕДОВАННОГО  
ОНКОГЕНЕЗА**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2015

Работа выполнена на кафедре биохимии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» и в лаборатории онкологического центра «Fox Chase Cancer Center» (Филадельфия, США) в рамках Open Lab «Молекулярные основы патогенеза и терапии опухолевых клеток» (проект «МОТОЗ», КФУ)

**Научные руководители:** кандидат биологических наук, доцент  
**Фаттахова Альфия Нурлимановна**

кандидат медицинских наук  
**Асцатуров Игорь Александрович**

**Официальные оппоненты:** **Бойчук Сергей Васильевич**  
доктор медицинских наук, профессор,  
заведующий кафедрой общей и клинической  
патологии ГБОУ ВПО «Казанский  
государственный медицинский  
университет» (г. Казань);  
**Цейликман Вадим Эдуардович**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий кафедрой «Биологическая  
химия» ГБОУ ВПО «Южно-Уральский  
государственный медицинский  
университет» (г. Челябинск)

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН, г. Казань.

Защита диссертации состоится 24 сентября 2015 г. в 13<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания учёного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь Диссертационного  
совета, доктор биологических наук,  
профессор

 **Абрамова З. И.**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** По данным Международного агентства по изучению рака число случаев онкологических заболеваний неуклонно растёт с каждым годом по всему миру, достигнув в 2012 году 14.1 миллионов новых случаев (для сравнения 12.7 млн в 2008 году) и 8.2 млн смертей (7.6 млн в 2008 году) (Ferlay et al., 2013). Онкологические заболевания являются результатом нарушения контроля роста и деления клетки вследствие генетических изменений, таких как активация онкогенов и подавление генов онкосупрессоров (Vogelstein and Kinzler, 2004; Croce, 2008).

Существующие на сегодняшний день методы борьбы с онкологическими заболеваниями, направленные на подавление пролиферации и жизнеспособности опухолевых клеток, зачастую приводят к тяжёлым побочным эффектам, т.к. затрагивают не только опухолевые, но и нормальные клетки. В настоящее время активно развивается таргетная терапия (от англ. «target» – мишень) – подход, при котором лекарственное вещество воздействует на конкретную мишень, затрагивая преимущественно опухолевую клетку или влияя на непосредственное её микроокружение (Widakowich et al., 2007). Несмотря на значительные успехи в развитии таргетной терапии, проблема лечения онкологических заболеваний остаётся нерешённой и требует выявления и изучения новых эффективных мишеней и направленных на них лекарственных препаратов.

Одним из распространённых подходов таргетной терапии к подавлению пролиферации опухолевых клеток является воздействие на сигнальные пути, регулирующие митотические процессы клетки и часто гиперактивированные именно в раковых клетках (Schmit and Ahmad, 2007). Однако при таком подходе обычно возникает проблема резистентности к лекарственному препарату за счёт активации обходных сигнальных путей (Cortot and Janne, 2014). Другой подход представляет собой воздействие на метаболические пути в клетке, которые обычно также изменены и гиперактивированы именно в опухолевых клетках (Boroughts and DeBerardinis, 2015). Всё большее внимание

учёных привлекает метаболизм холестерина и регуляция гомеостаза холестерина в клетке. Холестерин, его метаболиты и производные играют незаменимую роль в клетке и в организме в целом, затрагивая сигнальные, структурообразующие, пролиферативные процессы в клетке (Murai, 2015). При этом известно, что активно пролиферирующие опухолевые клетки нуждаются в повышенном уровне холестерина, что приводит к активации как метаболических процессов его биосинтеза *de novo* (Pitroda et al., 2009; Silvente-Poirot and Poirot, 2014), так и процессов поглощения клеткой холестерина извне (Guo et al, 2011). Один из примеров воздействия на метаболизм холестерина был описан в работе Сухановой и др., где было показано, что удаление ферментов биосинтеза холестерина NSDHL (НАД(Ф)-зависимой стерол дегидрогеназы) и SC4MOL (стерол-С4-метил оксидазы) приводит к накоплению их субстратов (мейоз активирующих стеролов – МАС) и, как результат этого, к повышению чувствительности (сенситизации) опухолевых клеток к блокаторам рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), а также подавлению роста и пролиферации опухолевых клеток (Sukhanova et al., 2013). Описанное явление, однако, требует дальнейшего изучения с целью выявления мишени, на которую воздействуют МАС, и механизма, посредством которого данная мишень вызывает наблюдаемые эффекты.

**Цель настоящей работы** заключалась в выявлении механизма, посредством которого нарушение метаболизма холестерина в клетке на уровне ферментов НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы и стерол-С4-метилоксидазы воздействует на регуляцию онкогенных сигнальных путей в клетке.

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

1. Выяснить функции ферментов биосинтеза холестерина НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы и стерол-С4-метилоксидазы как регуляторов пролиферации клеток;
2. Определить внутриклеточную мишень, на которую воздействуют мейоз активирующие стеролы, накапливающиеся в клетке при выключении

ферментов НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы и стерол-С4-метилоксидазы;

3. Исследовать роль НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы и стерол-С4-метилоксидазы в регуляции гомеостаза холестерина в клетке;

4. Выяснить эффект выключения фермента НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы на развитие KRas-зависимого канцерогенеза в эпителиальных клетках;

5. Провести анализ одновременного воздействия на биосинтез холестерина и на сигнальный путь EGFR в опухолевых клетках.

**Научная новизна.** В данной работе был впервые описан механизм воздействия накопления МАС на онкогенные сигнальные пути клетки. Было показано, что накопление МАС в результате удаления ферментов биосинтеза холестерина NSDHL и SC4MOL приводит к активации печеночного рецептора X (LXR) и его транскрипционных мишеней, что способствует в результате уменьшению общего уровня холестерина в клетке и препятствует потреблению клеткой холестерина извне. Такое холестериновое истощение, вызванное накоплением в клетке МАС, приводит к нарушению онкогенных сигнальных путей. При этом нами впервые было продемонстрировано, как выключение ферментов NSDHL и SC4MOL препятствует развитию KRas<sup>G12D</sup>-опосредованного онкогенеза на моделях *in vivo* и *in vitro*. Кроме того, основываясь на полученных данных, мы также впервые показали, что одновременное воздействие на компоненты онкогенных сигнальных путей и путей регуляции гомеостаза холестерина, оказывает синергический эффект на опухолевые клетки, способствуя подавлению их роста и пролиферации.

**Научно-практическая значимость работы.** Полученные результаты способствуют разработке новых эффективных стратегий таргетной терапии, основанных на одновременном воздействии на пути регуляции гомеостаза холестерина в клетке и онкогенные сигнальные пути, и обладающих синергическим воздействием. При этом открываются возможности как для создания новых препаратов, направленных на ингибирование ферментов

NSDHL и SC4MOL, так и для более эффективного совместного использования уже существующих лекарственных средств, регулирующих внутриклеточный гомеостаз холестерина и ингибирующих онкогенные сигнальные пути в клетке.

Кроме того, описанный механизм является интересным для понимания взаимодействий и связей между метаболическими и сигнальными путями в клетке. Таким образом, полученные данные представляют интерес как с практической точки зрения в качестве новых стратегий для создания терапевтических препаратов, так и с точки зрения теоретических дисциплин: молекулярной биологии и биохимии.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Накопление субстратов ферментов НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы и стерол-С4-метилоксидазы активирует транскрипционный фактор печёночный X рецептор и его мишени в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.
2. Выключение гена *Nsdhl*, продуктом которого является фермент НАД(Ф)-зависимая стероидная дегидрогеназа, подавляет пролиферацию кератиноцитов и фибробластов мышей *in vitro*.
3. Выключение гена *Nsdhl*, продуктом которого является фермент НАД(Ф)-зависимая стероидная дегидрогеназа, препятствует прогрессии KRas-зависимого канцерогенеза в эпителиальных клетках мышей *in vivo*.
4. Воздействие на ключевые факторы гомеостаза холестерина в клетке и подавление EGFR-зависимого сигнального пути оказывает синергический антипролиферативный эффект на клетки карциномы головы и шеи человека.

**Апробация работы.** Результаты исследования докладывались на 3-ей и 4-ой международных научно-практических конференциях «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2013 и 2014), на 2-ом и 3-ем ежегодных симпозиумах университета Тэмпл, посвящённых проблемам трансляционной науки (Филадельфия, США, 2013 и 2014), на ежегодной конференции Американской ассоциации исследования опухоли (Сан-Диего, США, 2014), на 18-ой и 19-ой ежегодных конференциях онкологического института Фокс Чейз (Филадельфия, США, 2013 и 2014).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, среди которых 1 публикация в рецензируемом журнале, включенном в список ВАК и 3 публикации в журналах базы SCOPUS.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 104 страницах машинописного текста, включает 33 рисунка. Библиография включает 132 наименования.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования. В экспериментах *in vitro* были использованы клеточные линии эпидермоидных карцином человека A431, FaDu, SCC61 и SCC25. Для продукции вируса использовали эмбриональные клетки почки человека HEK293T. Мышиные эмбриональные фибробласты (МЭФ) были получены из мышинных эмбрионов на 13.5 день развития стандартным методом (Xu, 2005). Эксперименты *in vivo* проводили на мышах следующих линий: мыши, несущие *Nsdhl<sup>flx5</sup>* аллель, мыши линий *129S/Sv-Krastm4Tyj/J*, *Tg(Krt5-Cre/ERT2)Ajdg* и *Tg(KRT14-cre)1Amc/J*.

Препарация и анализ образцов кожи мышей. Кожную биопсию собирали с дорсальной части мыши. Образцы делили на три части, из которых первую фиксировали в формалине для дальнейшего иммуногистохимического (ИГХ) анализа; из второй части получали РНК с помощью «TRIzol» реагента в соответствии с инструкцией производителя; третью часть использовали для получения тканевых лизатов. Кончик хвоста мыши использовали для генотипирования. Для ИГХ анализа фиксированные образцы кожи заливались в парафин по стандартному методу (Fischer et al., 2008). Парафиновые слайды окрашивали антителами в соответствии с инструкцией производителя. Затем слайды сканировали и анализировали при помощи сканера «Aperio ScanScope CS».

Исследование кожных папиллом *in vivo*. Для индукции образования кожных папиллом использовали мышей, полученных в результате скрещивания, как показано на рис. 1. Мышам в возрасте 4 недель давали тамоксифен, *per os*, в дозе 40 мг/кг раз в день в течение 5 дней. Мышей обследовали раз в неделю визуально на наличие изменений кожных покровов. По окончании эксперимента папилломы и образцы кожи собирали для выделения ДНК, приготовления белковых лизатов и парафиновых срезов.

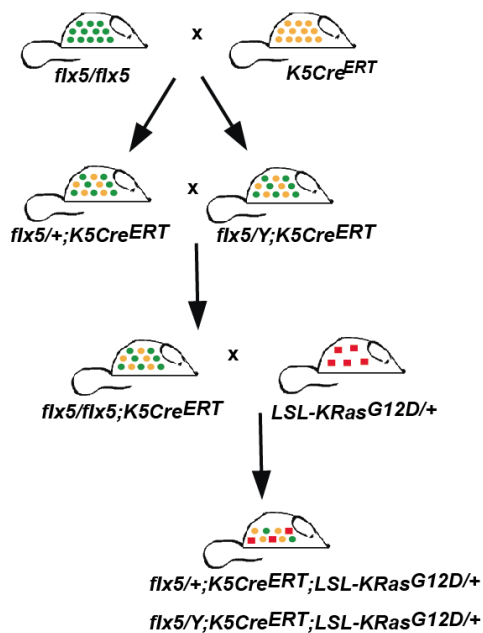


Рис. 1. Схема скрещивания мышей для получения «трёхгенной» модели. Самок *Nsdhl*<sup>flx5/flx5</sup> (показаны как *flx5/flx5*) скрестили с самцами линии *Tg(Krt5-Cre/ERT2)Ajdg* (показаны как *K5Cre*<sup>ERT</sup>). Полученное в результате потомство использовали для следующего скрещивания, чтобы получить самок *Nsdhl*<sup>flx5/flx5</sup> несущих *K5Cre*<sup>ERT</sup> аллель. Самки *Nsdhl*<sup>flx5/flx5</sup>; *K5Cre*<sup>ERT</sup> были далее скрещены с *LSL-KRas*<sup>G12D/+</sup> самцами, чтобы получить потомство, состоящее из *Nsdhl*<sup>flx5/+</sup>; *K5Cre*<sup>ERT</sup>; *LSL-KRas*<sup>G12D/+</sup> самок и *Nsdhl*<sup>flx5/Y</sup>; *K5Cre*<sup>ERT</sup>; *LSL-KRas*<sup>G12D/+</sup> самцов, которое можно использовать для индукции папиллом.

Анализ уровня экспрессии генов методом количественной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Анализ уровня экспрессии генов проводили методом количественной полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Образцы РНК выделяли из клеток, выращенных в культуре, с помощью набора реагентов «RNeasy Mini Kit» и из мышинных тканей с использованием реагента «TRIzol» в соответствии с протоколами производителей.

Трансфекция клеток малой интерферирующей РНК. Трансфекцию клеток малой интерферирующей РНК (миРНК) проводили при помощи трансфекционного реагента HiPerfect в соответствии с инструкцией производителя (Qiagen, США). Конечная концентрация миРНК в полученной смеси составляла 10 нМ. Лекарственные вещества добавлялись к клеткам через 24 часа после начала трансфекции.



Анализ жизнеспособности клеток *in vitro*. Анализ жизнеспособности клеток проводили с помощью реагента Cell Titer Blue в соответствии с инструкцией производителя (Promega, США).

Анализ уровня экспрессии белков методом Вестерн Блот. Для анализа уровня экспрессии белков использовали клеточные или тканевые лизаты, полученные посредством разрушения клеток или тканей, в буфере RIPA или T-PER, соответственно. Образцы разгоняли методом электрофореза в градиентном полиакриламидном геле, затем белки переносили на поливинилиденфторидную мембрану методом электроблоттинга. Мембрану с белками блокировали, инкубировали с первичными и вторичными антителами и визуализировали белки в соответствии с рекомендациями производителей антител.

Анализ активации LXR с использованием люциферазного репортера. Клетки МЭФ заражали лентивирусом, кодирующим репортерный ген люциферазы под контролем минимального (m)CMV промотера и tandemных повторов элемента, отвечающего на транскрипционную активность LXR. Об уровне экспрессии люциферазы, а, значит, и транскрипционной активности LXR судили по интенсивности люминесценции при помощи планшетного спектрофотометра.

Получение стабильных клонов SCC61 клеток с повышенной экспрессией белка LXR. кДНК гена *NR1H3*, кодирующая LXR $\alpha$ , была исходно получена в составе вектора *pDONR221* и затем была клонирована в вектор *pLEX-HA-MYC* и упакована в лентивирусные частицы. Лентивирусом инфицировали клетки SCC61, заражённые клоны были отобраны методом селекции на пурамицине.

Окрашивание клеток на  $\beta$ -галактозидазу, связанную со старением. Окрашивание клеток на  $\beta$ -галактозидазу, экспрессируемую при старении клеток ( $\beta$ -ГАСС), проводили при помощи набора реагентов «Senescence beta – Galactosidase Staining Kit» по инструкции производителя (Cell Signaling, США).

Статистический анализ. Для статистического анализа уровня экспрессии биомаркеров в образцах кожи, для анализа толщины эпидермиса и

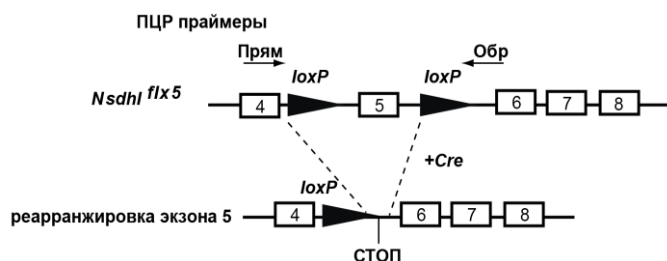
пролиферации сальных желёз, роста папиллом и уровня экспрессии NSDHL в папилломах использовали тест Уилкоксона. Кривые роста и жизнеспособности были оценены методом регрессионного анализа. Статистически достоверным во всех случаях принималось различие при значении  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние конститутивного и тамоксифен-обусловленного удаления NSDHL на пролиферацию кератиноцитов мышей в опытах *in vivo*

Для определения влияния выключения фермента NSDHL на пролиферацию кератиноцитов мышей нами был использован подход, основанный на сайт-специфической рекомбинации генов *Cre-lox*. В нашей работе были использованы геномодифицированные мыши линии *Nsdhl<sup>flx5</sup>*, любезно предоставленные доктором Херман. У этих мышей экзон 5 гена *Nsdhl* обрамлён *loxP*-сайтами, расположенными в одинаковой ориентации. При введении в систему активного фермента Cre-рекомбиназы, происходит вырезание экзона 5, что приводит к синтезу укороченного, неактивного фермента NSDHL (далее *Nsdhl<sup>δ5</sup>*), как схематично изображено на рис. 2.

Рис. 2. Схема реарранжировки *Nsdhl* гена. «Прям» и «Обр» – прямой и обратный праймеры для ПЦР, соответственно.



Мыши *Nsdhl<sup>flx5</sup>* были

скрещены с мышами линии *Tg(KRT14-cre)1Amc/J*, экспрессирующими Cre-рекомбиназу конститутивно под промотором *Keratin14* (далее *K14Cre*), т.е. преимущественно в кератиноцитах. Ген *Nsdhl* связан с X-хромосомой, однако, полученное потомство мышей родилось жизнеспособным, с примерным соотношением самцов и самок 1:1, что говорит об отсутствии летальности эмбрионов при удалении NSDHL в кератиноцитах кожи. Однако все гомозиготные самцы *K14Cre; Nsdhl<sup>δ5/Y</sup>* с тотальной инактивацией NSDHL в кератиноцитах кожи умерли в течение 24 часов после рождения с признаками дегидратации. Гетерозиготные по потере NSDHL самки *K14Cre; Nsdhl<sup>δ5/+</sup>*

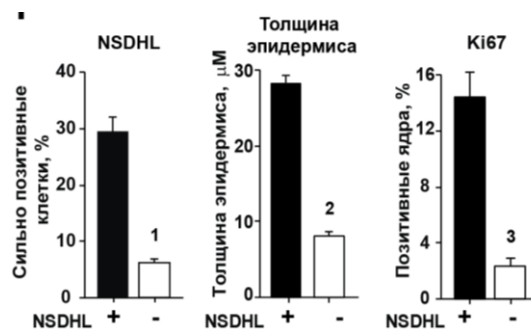
оставались жизнеспособными, но у них наблюдалось нарушение развития волосяного покрова, что вело к появлению «полосатого» фенотипа (рис. 3).



Рис. 3. «Полосатый» фенотип мышей при мозаичном типе удаления NSDHL в кератиноцитах кожи гетерозиготных самок  $K14Cre; Nsdhl^{\delta5/+}$ .

ИГХ анализ кожи гетерозиготных самок  $K14Cre; Nsdhl^{\delta5/+}$  в возрасте 4 недель показал уменьшение экспрессии маркера пролиферации Ki-67 и утоньшение участков кожи при удалении в них NSDHL (рис.4). Таким образом, было показано, что удаление NSDHL в кератиноцитах кожи мышей на постнатальном этапе развития *in vivo* приводит к подавлению их пролиферации и препятствует нормальному развитию кожного и волосяного покровов.

Рис. 4. Количественная оценка ИГХ окраски образцов кожи самок  $K14Cre; Nsdhl^{\delta5/+}$  в возрасте 4 недель;  
(1)  $p=3*10^{-6}$ ; (2)  $p=3*10^{-16}$ ; (3)  $p=2*10^{-5}$ .



Для выключения NSDHL у мышей во взрослом состоянии мы скрестили животных линии  $Nsdhl^{flx5}$  с  $Tg(Krt5-Cre/ERT2)Ajdg$  мышами, экспрессирующими тамоксифен-активируемую Cre-рекомбиназу под промотером *Keratin 5* (далее  $K5Cre^{ERT}$ ). Самцы полученного потомства получали тамоксифен для активации Cre-рекомбиназы. Генетическая реарранжировка была подтверждена методом ПЦР. После курса приёма тамоксифена волосяные фолликулы участка дорсальной кожи были приведены к одному этапу волосяного цикла депилированием. Удаление NSDHL в кератиноцитах задерживало восстановление волосяного покрова кожи мышей. Однако ИГХ анализ биопсии кожи этих мышей не выявил существенных различий ни в толщине эпидермиса, ни в уровне экспрессии маркера пролиферации Ki-67, что говорит об отсутствии токсичности при удалении NSDHL у взрослых организмов локально (в данном случае в кератиноцитах).

Влияние удаления NSDHL на появление и развитие  $KRas^{G12D}$ -  
опосредованных кожных папиллом *in vivo*

Основываясь на данных о том, что потеря NSDHL в кератиноцитах приводит к подавлению их пролиферации, мы предположили, что удаление NSDHL в кератиноцитах кожи, несущих мутантный онкоген  $KRas^{G12D}$ , будет препятствовать развитию кожных опухолей у мышей *in vivo*. Для этого мы скрестили мышей трёх линий: мышей, несущих ген  $K5Cre^{ERT}$ , мышей  $Nsdhl^{flx5}$  и мышей с генетическим конструктом  $LSL-KRas^{G12D}$ . В результате активации тамоксифеном в кератиноцитах Cre-рекомбиназа вырезает экзон 5 из  $Nsdhl^{flx5}$  гена, приводя к прекращению экспрессии функционального белка NSDHL, а также вырезает «стоп» последовательность, расположенную перед мутантным  $KRas^{G12D}$ , приводя к его экспрессии. Генетическая реарранжировка в результате даёт ген  $Lox-KRas^{G12D}$ , как схематически изображено на рис. 5. Подтверждение рекомбинации генов было получено методом ПЦР.

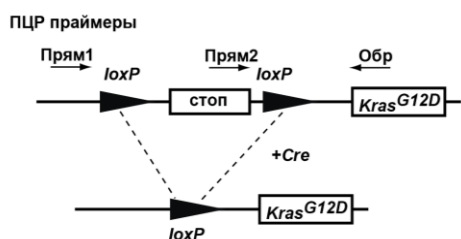


Рис. 5. Схема реарранжировки генетического конструкта  $LSL-KRas^{G12D}$  (Jackson et al., 2001).

Ещё до образования кожных папиллом у мышей, анализ биопсии кожи показал, что потеря NSDHL в кератиноцитах противостояла развитию гиперпролиферации сальных желёз в дермальном слое кожи и утолщению межфолликулярного эпидермиса, вызванным экспрессией мутантного  $KRas^{G12D}$  и наблюдаемым в группах мышей с мозаичной экспрессией фермента ( $Nsdhl^{\delta5/+}$ ) или с экспрессией NSDHL дикого типа ( $Nsdhl^{+/+}$ ) (рис. 6).

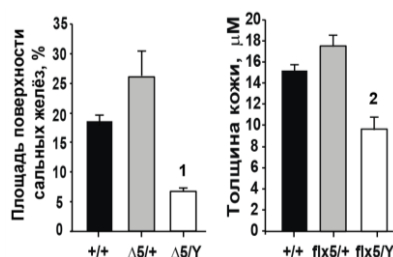


Рис. 6. Количественный анализ площади поверхности сальных желёз и толщины эпидермиса в образцах кожи мышей, несущих  $K5Cre^{ERT}$ ;  $LSL-KRas^{G12D/+}$  и разных по  $Nsdhl^{flx5}$  статусу, через 4 недели после индукции Cre-рекомбиназы; (1)  $p=0.03$ ; (2)  $p=6*10^{-10}$ .

Более того было показано, что потеря NSDHL препятствовала развитию кожных папиллом, вызванных экспрессией мутантного  $KRas^{G12D}$  в

кератиноцитах (рис. 7). Так, папилломы у мышей из группы с тотальной потерей NSDHL ( $Nsdhl^{\delta 5/Y}$ ) росли медленно, в то время как опухоли контрольной группы ( $Nsdhl^{+/+}$ ) росли быстро, представляли собой крупные, хорошо снабжённые кровью образования на коже, а в группе с мозаичной экспрессией NSDHL наблюдались опухоли обоих фенотипов. Потеря фермента в папилломах при этом подтверждалась методом Вестерн Блот.

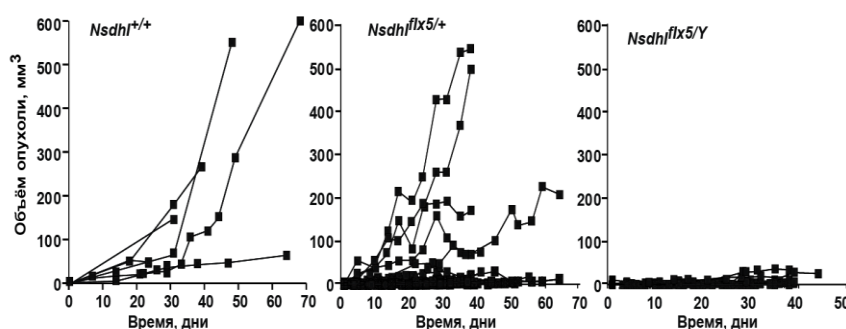


Рис. 7. Индивидуальные кривые роста для каждой опухоли в мышах трёх групп.

Влияние удаления  
NSDHL на скорость роста и процесс иммортализации  $KRas^{G12D}$ -мутантных  
первичных мышинных эмбриональных фибробластов

Полученные на кератиноцитах данные были подтверждены на модели первичной культуры мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ). Первичная культура МЭФ была получена из трансгенных мышей, описанных выше. МЭФ на 1-ом пассаже были инфицированы аденовирусом, кодирующим Cre-рекомбиназу, для активации экспрессии  $KRas^{G12D}$  и удаления NSDHL. Было показано, что потеря NSDHL приводила к подавлению пролиферации клеток, несмотря на активированный мутантный  $KRas^{G12D}$  (рис. 8). Клетки с потерей NSDHL претерпевали ускоренное клеточное старение, что оценивалось по уровню экспрессии маркера клеточного старения  $\beta$ -галактозидазы, связанной со старением ( $\beta$ -ГАСС).

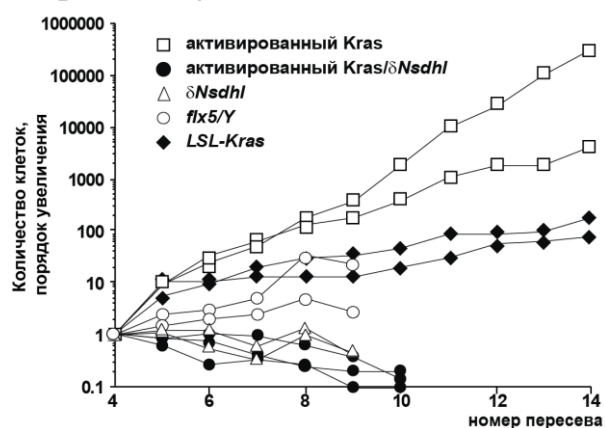


Рис. 8. Потеря NSDHL отменяет гиперпролиферативный эффект активированного  $KRas^{G12D}$  в первичной культуре МЭФ.

Активация экспрессии мишеней LXR в кератиноцитах мышей при удалении NSDHL в экспериментах in vivo

Основываясь на данных литературы о том, что удаление NSDHL приводит к накоплению мейоз активирующих стеролов (MAC), а MAC, в свою очередь, являются лигандами транскрипционного фактора LXR, мы исследовали уровень экспрессии мишеней LXR в коже мышей при удалении NSDHL. Мышинные модели, использованные для этого аналогичны описанным ранее. Анализ биопсии кожи мышей (рис. 9А), белковых лизатов кожи (рис. 9Б) и экспрессии мРНК показали, что в коже новорождённых мышей *K14Cre; Nsdhl*<sup>Δ5/Y</sup> происходит значительное повышение экспрессии ABCA1 (обратного транспортера холестерина – мишени LXR), в сравнении с контрольной группой.

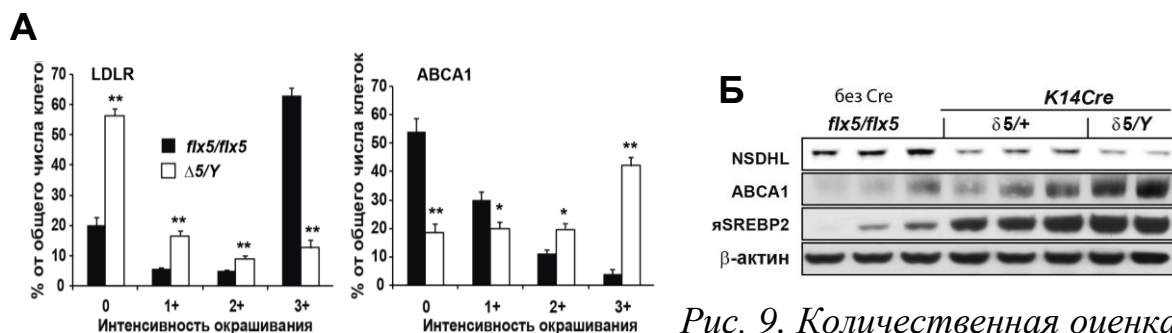


Рис. 9. Количественная оценка ИГХ окраски кожи новорождённых мышей (А). Анализ уровня экспрессии белков в лизатах кожи мышей методом Вестерн Блот (Б); \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 10^{-9}$ .

Уровень экспрессии рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), подвергающегося деградации при активации LXR, понижался при потере NSDHL (рис. 9А, 9Б). Активация экспрессии ABCA1, мембранного транспортера, откачивающего холестерин из клетки, и деградация рецептора LDLR, способствующего поступлению холестерина в клетку, а также остановка биосинтеза холестерина вследствие удаления NSDHL совместно приводят к понижению уровня холестерина в клетке, что приводит к компенсаторной активации фактора транскрипции SREBP-2, регулирующего экспрессию генов биосинтеза холестерина. Такая компенсаторная активация SREBP-2 наблюдалась и в исследуемых образцах (рис. 9Б). Анализ кожи 4-х недельной гетерозиготной самки с мозаичной экспрессией NSDHL показал аналогичные



результаты. Таким образом, полученные *in vivo* данные поддерживают гипотезу об активации LXR и его мишеней при потере NSDHL.

### Активация экспрессии мишеней LXR в NSDHL-дефицитных мышечных

#### эмбриональных фибробластах *in vitro*

Данные, полученные на кератиноцитах, были подтверждены и на первичной культуре МЭФ. Клетки МЭФ были получены из эмбрионов мышей линии *Bra<sup>1H</sup>*, любезно предоставленных доктором Херман и дефицитных по NSDHL. Было показано, что МЭФ, лишённые фермента NSDHL, экспрессируют повышенный уровень ABCA1 (рис. 10).

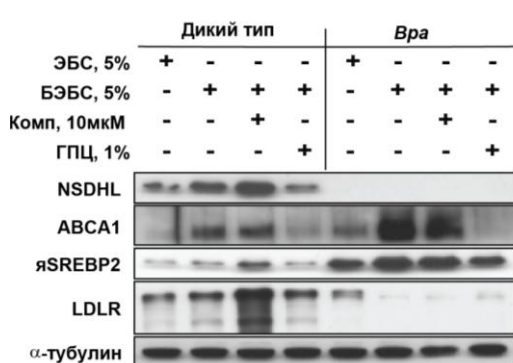


Рис. 10. Активация мишеней LXR в NSDHL-дефицитных клетках первичной культуры МЭФ *Bra<sup>1H</sup>*. Анализ белковых клеточных лизатов методом Вестерн Блот (ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка, БЭБС – безлипидная ЭБС, Комп – компактин, ГПЦ – 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин, ДТ – дикий тип).

Кроме того, NSDHL-дефицитные клетки имели повышенный уровень мРНК гена *Idol*, который является прямой мишенью LXR и опосредует деградацию LDLR. При этом, разница проявлялась особенно сильно в безлипидных условиях, из-за того, что в таком случае клетки компенсаторно активизировали синтез холестерина, что видно по индукции частичного протеолиза ядерной активной формы яSREBP-2 в этих клетках (рис. 10), и в результате отсутствия NSDHL в них накапливалось ещё больше МАС, оказывающих ещё большее влияние на LXR и его мишени.

### Активация LXR при удалении NSDHL в экспериментах с люциферазным

#### репортёром *in vitro*

Для получения прямых доказательств активации индукции LXR при удалении NSDHL, мы оценили активацию транскрипционного фактора с помощью люциферазного репортера в клетках МЭФ, полученных из мышей линии *Bra<sup>1H</sup>*. Было показано, что NSDHL-дефицитные клетки экспрессируют статистически значимо больше люциферазы, чем контрольные, и, значит, потеря NSDHL действительно приводит к активации транскрипционного

фактора LXR.

Влияние удаления NSDHL и SC4MOL на активацию мишеней LXR в  
опухолевых клетках SCC61 и A431

Основываясь на полученных данных, мы показали возможность индукции таких же эффектов и в опухолевых клетках человека при удалении в них ферментов NSDHL и фермента, работающего на том же этапе С4-деметилирования предшественника холестерина – SC4MOL. Нами было показано, что выключение исследуемых ферментов с помощью короткой шпилечной РНК (кшРНК) в клетках эпидермоидной карциномы человека А431 и SCC61 приводит к активации экспрессии мишеней LXR ABCA1, ядерной активной формы SREBP-2, а также деградации LDLR (рис. 11).

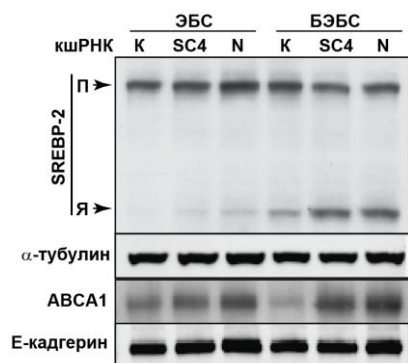


Рис. 11. Выключение ферментов NSDHL (N) и SC4MOL (SC4) в клетках SCC61 с помощью кшРНК приводит к активации экспрессии мишеней LXR – ABCA1 и яSREBP-2. (K – контрольная кшРНК, ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка, БЭБС – безлипидная ЭБС, Я – ядерная форма SREBP-1, П – форма SREBP-2, предшествующая отщепленной).

Обратимость эффекта активации LXR в  
результате выключения вышележащего по пути биосинтеза холестерина  
фермента CYP51A1

Нужно отметить, что уровень тотального холестерина в клетках при выключении NSDHL и SC4MOL с помощью кшРНК действительно снижался по сравнению с контролем. Однако наблюдаемые эффекты являлись результатом именно накопления МАС в клетках, а не снижением уровня холестерина. Это было показано с помощью выключения вышележащего по пути биосинтеза холестерина фермента CYP51A1. Такое выключение препятствовало накоплению МАС в клетке и соответственно мы наблюдали снижение уровня экспрессии ABCA1 и восстановление LDLR (рис. 12), несмотря на потерю NSDHL в клетках.



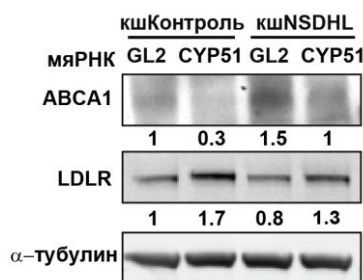


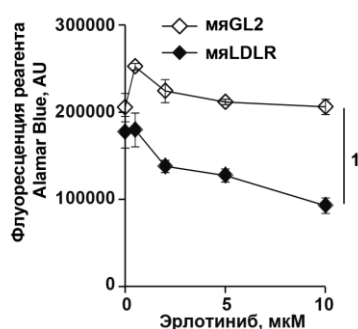
Рис. 12. Выключение CYP51A1 с помощью малой ядерной РНК (мяРНК) в NSDHL-дефицитных A431 клетках (GL2 – контрольная мяРНК, цифры показывают плотность белковых полосок, нормализованную на общую белковую загрузку).

Повышение чувствительности опухолевых клеток SCC61 к агонистам LXR при повышении экспрессии LXRα в этих клетках

Чтобы подтвердить, что известные данные о роли LXRα как мишени МАС справедливы и для используемой нами модели – опухолевых клеток SCC61, мы получили стабильные клоны SCC61 клеток с повышенной экспрессией белка LXRα. Было обнаружено, что повышенная экспрессия белка LXRα в клетках SCC61 увеличивает чувствительность клеток к мейоз активирующему стеролу FF-MAS и к другому лиганду LXRα – 22(OH)-холестеролу. Таким образом, МАС действительно являются лигандами LXRα в опухолевых клетках SCC61.

Влияние нарушения гомеостаза холестерина на чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам рецептора EGFR

Во многих типах опухолей процессы как биосинтеза холестерина *de novo*, так и поглощения его извне регулируются сигнальным каскадом рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). С другой стороны было показано, что дефицит ферментов NSDHL и SC4MOL в опухолевых клетках приводит к нарушению сигнального пути EGFR. Основываясь на этих утверждениях и полученных данных, мы предположили, что комбинированное подавление метаболизма холестерина и сигнального пути EGFR может оказывать синергическое антипролиферативное влияние на опухолевые клетки человека. Клетки SCC61 нечувствительны к действию эрлотиниба *in vitro*. Нами было показано, что выключение LDLR в этих клетках с помощью мяРНК повышает



чувствительность SCC61 клеток к эрлотинибу (рис. 13).

Рис. 13. Подавление LDLR с помощью мяРНК повышает чувствительность клеток SCC61 к ингибитору EGFR эрлотинибу (кривые жизнеспособности клеток; GL2 – контроль). (1)  $p=3*10^{-11}$ .

Основываясь на этих данных и данных о том, что и эрлотиниб, и лиганды LXR подавляют экспрессию LDLR в клетках SCC61, мы показали, что устойчивые к эрлотинибу клетки SCC25 и SCC61 становились чувствительными к действию этого ингибитора EGFR в присутствии агонистов LXR FF-MAS и 22-(OH)-холестерола (рис. 14).

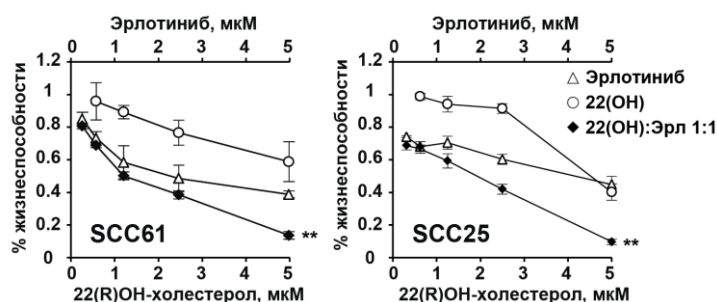


Рис. 14. Эффекты комбинации эрлотиниба и 22-(OH)-холестерола в клетках SCC25 и SCC61; \*\*,  $p < 0.01$ .

Кроме того известно, что экспрессия LDLR регулируется посредством транскрипционного фактора SREBP-1. Нами было показано, что ингибитор активации SREBP-1 фатостатин также повышает чувствительность опухолевых клеток A431 к действию эрлотиниба, что соответствует ранее описанным данным влияния подавления экспрессии LDLR на чувствительность клеток к эрлотинибу.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что выключение генов, продуктами которых являются ферменты НАД(Ф)-зависимая стероидная дегидрогеназа и стерол-С4-метилоксидаза, активирует транскрипционный фактор печёночный X рецептор в опухолевых и здоровых клетках.
2. Выключение генов, продуктами которых являются ферменты НАД(Ф)-зависимая стероидная дегидрогеназа и стерол-С4-метиолксидаза, приводит к активации печёночного X рецептора, и в результате этого, к повышению экспрессии обратного транспортера холестерина ABCA1 и деградации рецептора липопротеинов низкой плотности LDLR в опухолевых и здоровых клетках. В результате происходит понижение уровня тотального холестерина в клетках.
3. Выключение гена, продуктом которого является фермент НАД(Ф)-зависимая стероидная дегидрогеназа, способствует подавлению

пролиферации кератиноцитов и фибробластов мышей в опытах *in vivo* и *in vitro*.

4. На модели *in vivo* было показано, что дефицит фермента НАД(Ф)-зависимой стероидной дегидрогеназы в кератиноцитах кожи мышей препятствует развитию KRas<sup>G12D</sup>-опосредованных кожных папиллом.
5. Совместное воздействие на сигнальные пути транскрипционного фактора печёночного X рецептора и рецептора эпидермального фактора роста EGFR в моделях карцином головы и шеи человека оказывает синергическое антипролиферативное воздействие на опухолевые клетки.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы исследовали способ подавления пролиферации опухолевых клеток путём воздействия на один из важнейших метаболических путей – путь биосинтеза и гомеостаза холестерина. Мы показали, что потеря фермента биосинтеза холестерина NSDHL в кератиноцитах кожи мышей приводит к подавлению их пролиферации, а при экспрессии мутантного онкогена KRas<sup>G12D</sup> в этих клетках – препятствует развитию кожных папиллом. Такие же эффекты подавления пролиферации и препятствия KRas<sup>G12D</sup>-опосредованной иммортализации были обнаружены в экспериментах на первичной культуре клеток МЭФ. Результаты данного исследования позволяют связать наблюдаемые эффекты с накоплением MAC в клетке при потере NSDHL и SC4MOL и определяют ядерный стерол-связывающий рецептор LXR как критическую мишень для MAC. Кроме того, нами было обнаружено, что действие активированного LXR синергично по отношению к антагонистам рецептора эпидермального фактора роста EGFR. Описанные явления, таким образом, имеют большую практическую значимость, открывая новые подходы таргетной терапии, направленной на совместное воздействие на пути регуляции гомеостаза холестерина и сигнальный путь EGFR, оказывающее синергический антипролиферативный эффект на опухолевые клетки.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Габитова, Л.Р.** Асцатуров И.А. Удаление фермента NSDHL способствует клеточному старению мышечных эмбриональных фибробластов // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2015. – Т. 157, кн. 1. – С.127–139. – (перечень ВАК), автора – 0.8 п.л.
2. **Gabitova, L.,** Gorin A., Astsaturov I. Molecular Pathways: Sterols and receptor signaling in cancer // *Clinical Cancer Research*. – 2014. – Vol. 1. – P. 28-34, автора – 0.2 п.л.
3. Sukhanova, A., Gorin, A., Serebriiskii I.G., **Gabitova L.,** Zheng H., Restifo D., Egleston B.L., Cunningham D., Bagnyukova T., Liu H., Nikonova A., Adams G.P., Zhou Y., Yang D., Mehra R., Burtneess B., Cai K.Q., Klein-Szanto A., Kratz L.E., Kelley R.I., Weiner L.M., Herman G.E., Golemis E.A., Astsaturov I. Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGFR inhibitors via increased EGFR degradation // *Cancer Discovery*. – 2013. – Vol. 1. – P. 96-111, автора – 0.08 п.л.
4. Gorin, A., **Gabitova L.,** Astsaturov I. Regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2012. – Vol. 6. – P. 710-716, автора – 0.2 п.л.
5. **Габитова, Л.Р.** Инактивация фермента внутриклеточного синтеза холестерина NSDHL подавляет К-Ras-опосредованный канцерогенез in vivo / Л.Р. Габитова, А.О. Горин, А.Н. Фаттахова // Постгеномные методы анализа в биологической, исследовательской и клинической медицине: Сборник тезисов III международной конференции. Казань – 2012. – С.268-269, автора – 0.1 п.л.
6. **Gabitova, L.** The role of Liver X Receptor as the protein target of meiosis activating sterols / L. Gabitova, A. Gorin, D. Restifo, I. Astsaturov // The 4th International Conference on Science and Applied Research “Post-Genome Methods of Analysis in Biology and Laboratory and Clinical Medicine”. Kazan. – 2014, автора – 0.05 п.л.
7. **Gabitova, L.** Meiosis activating sterols suppress growth via Liver X-Receptor / L. Gabitova, A. Gorin, D. Restifo, I. Astsaturov // Third Annual Temple Translational Science Symposium: Book of abstracts. Philadelphia, PA. – 2014, автора – 0.05 п.л.
8. **Gabitova, L.** Meiosis activating sterols counteract KRas-driven epithelial carcinogenesis via an LXR-dependent mechanism / L. Gabitova, A. Gorin, D. Restifo, D. Yang, D. Cunningham, G.E. Herman, I.A. Astsaturov // Annual meeting of American Association for Cancer Research. San-Diego, CA. – 2014, автора – 0.04 п.л.

9. **Gabitova, L.** The role of C4-demethylation step of cholesterol biosynthesis in KRas-driven epithelial carcinogenesis / L. Gabitova, A. Gorin, D. Restifo, I. Astsaturov // 19<sup>th</sup> Annual Postdoctoral and Graduate Student Research Conference: Book of abstracts. Philadelphia, PA. – 2014. – P. 23, автора – 0.05 п.л.
10. **Gabitova, L.** The role of NSDHL deletion in KRas-driven tumor progression / L. Gabitova, A. Gorin, E. Banina, D. Restifo, I. Astsaturov // 18<sup>th</sup> Annual Postdoctoral and Graduate Student Research Conference: Book of abstracts. Philadelphia, PA. – 2013. – P. 36, автора – 0.04 п.л.
11. **Gabitova, L.** The role of NSDHL depletion in KRas carcinogenesis / L. Gabitova, A. Gorin, E. Banina, N. Beglyarova, D. Restifo, I. Astsaturov // Second Annual Temple Translational Science Symposium: Book of abstracts. Philadelphia, PA. – 2013, автора – 0.04 п.л.

Адрес для отзывов на автореферат: 420008, Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ к.104, отдел аттестации научных кадров, ученому секретарю диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З.И., факс: (843)238-76-01. E-mail: ziabramova@mail.ru